

1.

- (21) Appl.No 4414627/28-14
- (22) Filed: 25.04.88
- (71) Assignee: Institute of Clinical Immunology
- (72) Inventors: I.G. Tsylova, I. A. Orlovskaya, E.B. Brosalina, E.N. Demchenko,  
V.A. Koslov
- (53) 615.373(088.8)
- (56) B.I. Lord, I.G. Tsylova, I. A. Orlovskaya, V.A. Koslov. Immunology 1987, 4,  
14-20 / prototype /
- (54) Purification process for stem cell proliferation inhibitor

2.

(57) Abstract

This invention is related to medicine, particularly to the processes involved in the purification of bioactive compounds (BAC) from mammalian tissues. This goal of the invention is to increase the activity of BAC and to simplify the purification process from bone marrow cell extract.

The fraction of molecular weight 50-100 KD is separated on Amicon filters from the bone marrow cell extract. This fraction was separated by gel chromatography (Sephadex G-75), collecting the elution fraction with a molecular weight of 25 KD.

3.

Example

Bone marrow was obtained from the ribs of 10 half pigs and suspended to 2 liters of PBS. This was centrifuged at 2000 RPM for 20 minutes to eliminate bone marrow cells. The extract was passed through Amicon filters (XM-100 followed by PM-50), obtaining about 20 mg/ml of dry protein. The major component is albumin, according the electrophoretic analysis. Ammonium sulfate (40-80%) precipitation at 25° C resulted in a 20 fold increase in purity of BAC. Ion-exchange chromatography (DEAE-23 cellulose) elution was performed on a discontinuous gradient with sodium bicarbonate buffer (pH 6.0) Column volume 1.0 ml. Flow rate 4.0 ml/hour. Detection at 230 and 280 nm



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

для служебного пользования ЭКЗ. №

09 SU (Ш) 1561261

A1

(51) 5 А 61 К 35/28

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

2

(21) 4414627/28-14

(22) 25.04.88

(71) Институт клинической иммунологии СО АН СССР

(72) И.Г.Цырлова, Н.А.Орловская,  
Е.Б.Брасалина, Е.Н.Демченко  
и В.А.Козлов

(53) 615.373(088.8)

(56) Б.И.Лорд, И.Г.Цырлова, Н.А.Орловская, В.А.Козлов, Иммунология, 1987, № 4, с. 14-20.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРА  
ПРОЛИФЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ

(57) Изобретение относится к области иммунологии, в частности к способам получения препаратов, ингибирующих пролиферацию стволовых клеток крови. Целью изобретения является повышение активности целевого продукта. Способ осуществляется посредством получения клеток костного мозга, выделения экстракта с мол. мас. 50-100 кД, осаждения сульфатом аммония, фракционирования ионообменной хроматографией и разделением гельфильтрацией, мол.мас. целевого продукта около 25 кД.

Изобретение относится к области медицины, а именно к способам получения иммуноактивных препаратов из костного мозга.

Целью изобретения является повышение активности целевого продукта.

**П р и м е р.** Ребра свинных полутуп зачищают от мышечных волокон и жира, режут на куски, гидропрессом, например марки "Бнофизприбор", вымывают костный мозг. Центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин, удаляют (клетки костного мозга) ККМ, а экстракт подвергают ультрафильтрации, через мембраны Amicon (США) последовательно РМ-50, ХМ-100. Полученный продукт содержит около 20 мг сухого вещества в 1 мл раствора. В соответствии с данными электрофоретического анализа его основным компонентом явля-

ется. Далее полученный продукт очищают, осаждая сульфатом аммония при 23°C насыщенным 40-80%.

Полученный 20-кратной степени очистки по общей массе бнополимеров препарат фракционируют с помощью ионообменной хроматографии. Используют ДЭАЭ-23 целлюлозу, элюцию проводят ступенчатым градиентом натрияацетатного буфера pH 6,0.

Объем колонки 1 мл, скорость элюции 4 мл/ч. Детекцию проводят и при  $\lambda$  230 и 280 нм на хроматографе "Милликрон". Выделяют фракцию, которая элируется в 5 мл натрияацетатном буфере, как обладающую наибольшей активностью.

Данные электрофореза показывают, что из этой фракции удалена основная белковая примесь - альбумин, что приводит к дополнительной 4-кратной очистке. Далее проводят фракционирование по молекулярной массе с помощью

гельфилтрации, хроматографией на се-  
фадексе G-75.

Объем колонки 20 мл (20x1), ско-  
рость элиции 2 мл/ч. Элицию проводи-  
ли в 50 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl,  
рН 7,5). Детекцию проводят при  $\lambda$  230  
и 280 нм на хроматографе "Миллихром".  
Выделяют фракцию 5, как обладающую  
наибольшей активностью.

Данные хроматографии и электрофо-  
реза показывают, что полученное ВАР  
очищено еще в 20-30 раз.

Активность целевого продукта оце-  
нивали по ингибции пролиферации  
стволовых клеток крови (СКК) методом  
тимидинового самоубийства. При дозе  
препарата  $2 \cdot 10^{-2}$  мг пролиферация СКК  
(число клеток в S-фазе цикла) снижа-  
ется с 42,2% до 0 и следовательно ак-  
тивность составляет 42,2%. Активность

препарата, полученного известным  
способом, составляет 26,8%.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения ингибитора про-  
лиферации стволовых клеток крови пу-  
тем получения клеток костного мозга,  
центрифугирования и ультрафилтрации  
с выделением фракции с молекулярной  
массой от 50 до 100 кД, отли-  
ч а ю щ и й с я тем, что, с целью  
повышения активности, выделенную  
фракцию дополнительно осаждают 40-80%  
сульфатом аммония и фракционируют и  
ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-  
целлюлозе в ступенчатом градиенте нат-  
рийацетатного буфера рН 6,0 с после-  
дующим разделением по молекулярному  
весу с помощью гелфилтрации на  
G-75-сефадексе.